УДК 593.1:578.086

НОВЫЙ МЕТОД ПРИГОТОВЛЕНИЯ ГЛИЦЕРИНОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

А. В. Янковский

(Зоологический институт АН СССР)

При изучении экологии простейших (Protozoa) и мелких беспозвоночных (коловраток — Rotatoria, рачков — Entomostraca, тихоходок — Tardigrada и т. п.) следует сохранять и изучать фиксированных особей (in fixo). При правильном выборе фиксатора в нужной концентрации объекты годами сохраняются в прекрасном состоянии, детали строения у фиксированных особей видны очень четко. Фиксированный материал изучают под покровным стеклом на временных препаратах, чтобы предотвратить испарение фиксатора, края стекла можно окантовать вазелиновым маслом (не вазелином!). Однако лучше готовить постоянные препараты. Бальзам для окантовки непригоден, особенно для спиртового материала, т. к. рамка сохнет долго, и мельчайшие капельки бальзама, диффундируя под покровное стекло, загрязняют объекты. Быстро сохнущие (за сутки) полистироловая и эпоксидная рамки или суперцемент непрочно прилегают к предметному стеклу, легко отделяются от него бритвой, фиксатор часто испаряется через невидимые пустоты между стеклом и рамкой. Бальзам годится только для окантовки глицериновых препаратов, поскольку на границе бальзам—глицерин диффузия не происходит, но, как известно, нежные и даже панцирные объекты, заключаемые в глицерин, деформируются, сжимаются даже в слабых его растворах. Метод постепенного перехода в глицерин путем помещения объекта в смесь глицерина с формалином и испарения последнего в повседневной работе непригоден и, кроме того, при этом нельзя пользоваться глицерином стандартной концентрации.

Разрабатывая методы окантовки препаратов, мы обнаружили, что обработка фиксированных простейших смесью абсолютного спирта с эфиром практически полностью снимает деформирующее действие глицерина — объекты можно заключать даже в абсолютный глицерин. Поэтому удалось изменить метод приклеивания простейших спирт-эфир-целлоидином по Чену (Chen, 1944) для быстрого получения постоянных глицериновых препаратов. При навыке процесс изготовления массового препарата с момента фиксации пробы занимает 10 мин. Лучший фиксатор — 4%-ный формалин; применимы сулема (с ее отмывкой и йодированием) и осмий (Шампи), особенно для изучения кортикальных структур; смесь Буэна дает менее контрастные картины; спиртовые фиксаторы для метода «целлоидиновой пленки» непригодны.

После оседания фиксированных простейших на дно солонки их переносим пипеткой на предметное стекло, микропипеткой удаляем избыток фиксатора. В оставшемся тонком слое жидкости равномерно распределяем простейших (вдувая воздух из микропипетки), затем отсасываем остаток фиксатора. С высоты 1 *см* капаем на простейших (с небольшим интервалом) несколько капель свежей смеси абсолютного спирта с эфиром (1 : 1); в этот момент особи приклеиваются к стеклу, не деформируясь. Когда смесь растечется по стеклу, ставим его на ребро и заливаем сверху 1—2%-ным раствором целлоидина в смеси абсолютного спирта с эфиром. После стекания целлоидина, не давая простейшим высохнуть, на 1 мин. опускаем стекло в 70°-ный спирт, а затем — на 1—2 мин. в воду. Особи приклеены к стеклу и покрыты тонкой пленкой целлоидина, уплотнившегося в спирту. Отмыв спирт в воде, аккуратно вытираем стекло (вне круга с простейшими). Теперь объекты можно красить любым методом, либо заключать в глицерин (лучше готовить оба типа препаратов). Из красителей можно рекомендовать гематоксилин Бемера, не требующий длительного протравливания квасцами.

Хотя объекты, отмытые от спирта и эфира, приобрели почти неограниченную устойчивость к глицерину, лучше использовать 20—60%-ный, чтобы не слишком просветлять материал. Для разведения глицерин смешивают с фиксатором (формалином); применять сулему, осмий, пикриновую кислоту и т. д. нельзя, т. к. они или кристаллизуются на объектах, зачернивая их (сулема), или делают их малоконтрастными. Удалив после промывания в спирту и воде избыток последней и вытерев стекло, капаем на объекты глицерин-формол указанной выше концентрации, накрываем тонким покровным стеклом и, удалив фильтровальной бумагой избыток глицерина, выступивший из-под покровного стекла, делаем бальзамную рамку. Полужидкий (не густой!) бальзам пипеткой наносим одновременно на край покровного стекла и на предметное, ведя пипетку вдоль края стекла на высоте 0,5—1,0 *см*. Рамка сохнет несколько дней.

Приклеивание целлоидином обеспечивает стабильность положения особей на препарате и совершенно не изменяет их внешний вид. Глицерин-формоловые препараты не высохнут даже при повреждении покровного стекла, они сохраняются годами. Изучение фиксированных особей следует вести только при иммерсии, используя не сохнущее и легко стирающееся вазелиновое масло вместо обычного иммерсионного. Манипулируя конденсором и зеркалом микроскопа, можно применять косое освещение и выявлять нужные структуры — реснички, мембранеллы, кинетосомы, ротовые структуры, ядра, шипы и т. д. Можно пользоваться и фазовым контрастом, облегчающим изучение внутренних структур. Простейшие выглядят «как живые»; более того, видны даже структуры, в норме неразличимые у живых форм и видимые только на импрегнированных или окрашенных препаратах, — сеть аргирома, инфракинеты и др. Хорошо просматривается система циррусов гипотрих, щупальца сукторий, шипы хонотрих и т. д.

Метод в равной мере применим к морским и пресноводным, подвижным и прикрепленным, свободноживущим и паразитическим простейшим. С глицерин-формоловых препаратов получаются хорошие микрофотографии, объекты можно зарисовывать с помощью рисовального аппарата, неприменимого при осмотре живых форм.

Метод особенно рекомендуется для эколого-фаунистических работ по простейшим. Эти работы обычно не документируются препаратами. Поскольку детали строения живых простейших трудно различимы, имеется тенденция к упрощению, схематизации рисунков и к пририсовке ряда деталей, например ресничных рядов. Результат такого подхода — условное определение видов, применение общепринятых штампов вместо точных видовых названий (например, «*Vorticella microstoma*» в случае любой мелкой сувойки, «*Amphileptus fasciola*» для мелких амфилептид и т. д.). Для определения видов, объединяемых в эколого-фаунистических работах под названием «*Colpidium colpoda*», к примеру, нужно точно знать число ресничных рядов, неразличимых *in vivo* и прекрасно видных на формол-глицериновых препаратах.

ЛИТЕРАТУРА

Chen T. T. 1944. Staining nuclei and chromosomes in Protozoa. Stain Technol., v. 19.

Поступила 26.VI 1972 г.

A NEW TECHNIQUE FOR MAKING GLYCERINE PREPARATIONS

A. W. Jankowski

(Zoological Institute, Academy of Sciences, USSR)

Summary

Balsam diffusion from a binding frame may be avoided using glycerine-formol instead of pure formol for constant preparations destined for studies of Protoxoa and small invertebrates, e.g. plankton samples, «in fixo». Squeesing and deformation effects of glycerine disappear entirely after equal distribution of the objects on the slide and their adhesion by ether absolute alcohol — celloidin, with subsequent washing of the slide in diluted alcohol and water.